

コバルトゲラチンによる実験てんかん二次焦点巣 (Mirror Focus) の電子顕微鏡的研究

金沢大学医学部神経精神医学教室 (主任：山口成良教授)

勝 川 和 彦

(昭和60年7月29日受付)

成熟家兎 30 匹を用い、大脳皮質の area precentralis agrularis にコバルトゲラチンを置いて、てんかん焦点病巣を作成し、対側対称部位 (mirror focus) を脳波的、光学顕微鏡的、電子顕微鏡的に検索した。30 例中 20 例に経時的脳波記録を行い、その内 5 例で mirror focus に一次焦点と同期性の発作波が記録された。Mirror focus の光顕所見として、神経細胞の胞体が明調化を呈するものと萎縮性変化を示すものとが観察された。星状膠細胞は軽度の増殖が認められた。電顕所見として、まず神経細胞の変化として、粗面小胞体の配列が乱れ槽の開大が認められる細胞が観察された。また細胞質の粗面小胞体とリボゾームの分布密度が高い暗調細胞と、逆に粗面小胞体が縮小し、まばらな分布を示す明調細胞とが認められた。星状膠細胞の変化として、ミトコンドリアの増加と、粗面小胞体の腫脹した細胞がみられた。またフィラメントに富んだ突起の増加が観察され、この突起の一部が神経細胞を取り囲んでいる像がみられた。シナプスの変化として、Gray I 型 (軸索樹状突起) シナプスのシナプス小胞の数が減少し、小胞がシナプス膜に集まる傾向がみられた。今回の実験での星状膠細胞の変化は、mirror focus の過剰なカリウムを運搬するための生体防御機構として、星状膠細胞の突起が関与したものと考察した。

Key words electron microscopy, experimental epilepsy, mirror focus, cobalt.

てんかんの病理学的研究の歴史は古く、1825 年 Bouchet & Cazanviella のてんかん脳のアンモン角の報告が最初である。その後 1873 年 Jackson¹⁾により “The epilepsy is the name for occasional, abrupt, excessive, rapid and local discharge of gray matter.” と定義され、1929 年 Hans Berger²⁾が初めてヒトの脳波を報告してからは、てんかんの電気生理学的研究も盛んにおこなわれるようになった。動物を用いての実験てんかんは、電気生理学の裏付けのもとに様々なモデルが作製され、組織学的検索がなされているが、未だに明確な発生機序がみつからないのが現状である。

いくつかの金属を脳表面に塗布すると、てんかん焦点ができることが Kopeloff ら³⁾の報告以来知られている。中でもコバルトを用いる方法は、てんかんが慢性で自発性であるという点で、ヒトのてんかんに似て

おり、Dow⁴⁾, Fisher⁵⁾をはじめとして、広く実験に用いられている。反面、コバルトは毒性が強く、これまでの一次焦点における組織学的研究の結果は、いずれも組織壊死が著しい。それに対し二次焦点は、組織が保たれており、光顕的には変化がない報告^{6)~9)}が今までにみられている。しかし壊死による変化の影響のない二次焦点は微細構造の組織検索には意義ある材料といえる。今回の実験では、家兎の一侧の前頭葉にコバルトゲラチンを塗布し、脳波を経時的に記録し、脳波上対側半球に発作波 (鏡像焦点 mirror focus) が出現したことを確認した後、mirror focus 部の電子顕微鏡による検索を行った。

材料と方法

体重 2.5 kg~3.5 kg の成熟家兎 30 匹を用い、無痛の状態でネンブタール 30 mg/kg による静脈麻酔を施

Abbreviations: A, Astrocyte; AP, Process of astrocyte; D, Dendrite; ER, Rough endoplasmic reticulum; G, Golgi apparatus; GF, Gliofilament; I, Intracytoplasmic invagination; I I, Intranuclear inclusion; M, Mitochondria; N, Nucleus; S, Synapse.

し、頭皮を切開し、頭蓋骨の冠状縫合の吻側 4 mm, 矢状縫合より右側へ 2 mm の右 Area precentralis agranularis, Rose に相当する部位に歯科用ドリルを用いて直径約 3 mm の小孔を開け、その後硬膜に小切開を加えて、その部位の脳皮質上に粉末コバルト(直径 1~2 ミクロン) 約 50 mg を 5 % ゲラチン溶液に溶かしたものを置いた。その後直ちに歯科用セメントで

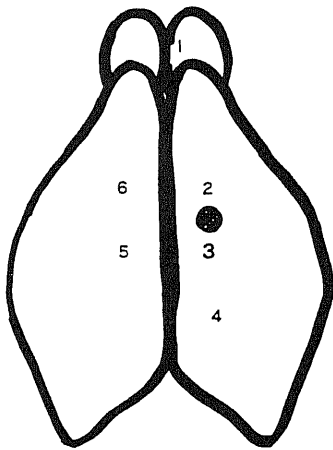


Fig. 1. Electrode placements noted on the diagram.

小孔をふさぎ、Fig. 1 に示すような位置の脳皮質硬膜上に接するように頭蓋骨にネジギを植え、ネジギは細いビニール被覆線により Winchester プラグに連結され、これを歯科用セメントで頭蓋骨上に固定して、これより皮質脳波を導出した。対照家兎としてガラスゲラチン 50 mg を用い、他は総てコバルトゲラチンと同様の方法で行った。脳波記録は 7 日目、14 日目、21 日目、28 日目に無麻酔、無拘束の状態で行い、4 週後に電頭用資料としてネプタールで麻酔後、右頸動脈に Venula 留置針®を用いて 0.9% 生理食塩水であらかじめ灌流し、血液を洗い出した後 2.5% グルタルアルデヒド液 (pH 7.4, 4°C) で灌流固定した。その後直ちに頭蓋骨を除去して mirror focus 部の組織小片をすばやく取り出し、3% グルタルアルデヒド液 (pH 7.4) に氷室内にて 2 時間浸透させて後、氷室内にて 2% OsO₄ で 2 時間固定した。尚、総ての固定液は 0.2 M リン酸緩衝液を用いた。固定された資料は順次高濃度のエタノールを用いて脱水し、プロピレンオキサイドで置換して、エポン 812 に包埋した。薄切は LKB-IV 型マイクロトームを使用し、ガラスナイフで行った。薄切切片は、炭素蒸着をしたコロジオン膜を貼った銅製メッシュにのせ、飽和酢酸ウランとクエン酸鉛とで二重染色を施し、日立 H-600 型、および日本電子 JEM-100B 型電子顕微鏡を使用して、直接倍率 3000~24000 倍で観察撮影し、さらに拡大して陽画を

N. 14

術後 2 日.

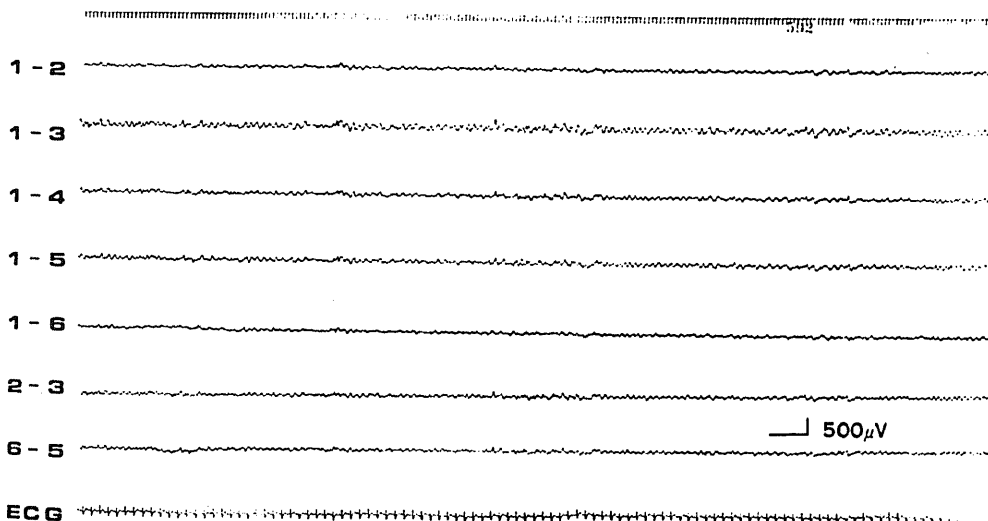


Fig. 2. EEG on 2 days after application of cobalt-gelatine to right motor cortex. No electrical abnormalities are present.

作製し、所見を判定した。又、3匹は光顕用としてホルマリン固定材料を用い、ヘマトキシリン・エオジン法、ニッスル法、ビルショウスキー鍍銀法、ホルツァー法などの各種の染色を施し観察した。

結 果

I. 脳波所見

30例中、20例に経時的に脳波記録を行った。この実

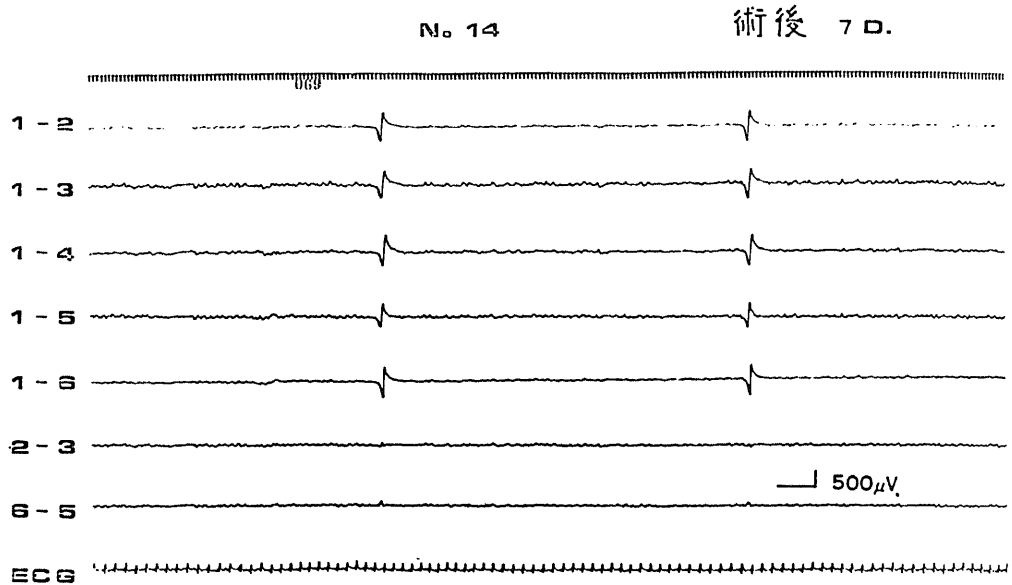


Fig. 3. EEG on 7 days after cobalt-gelatine application. Spike abnormalities in the primary lesion are seen.

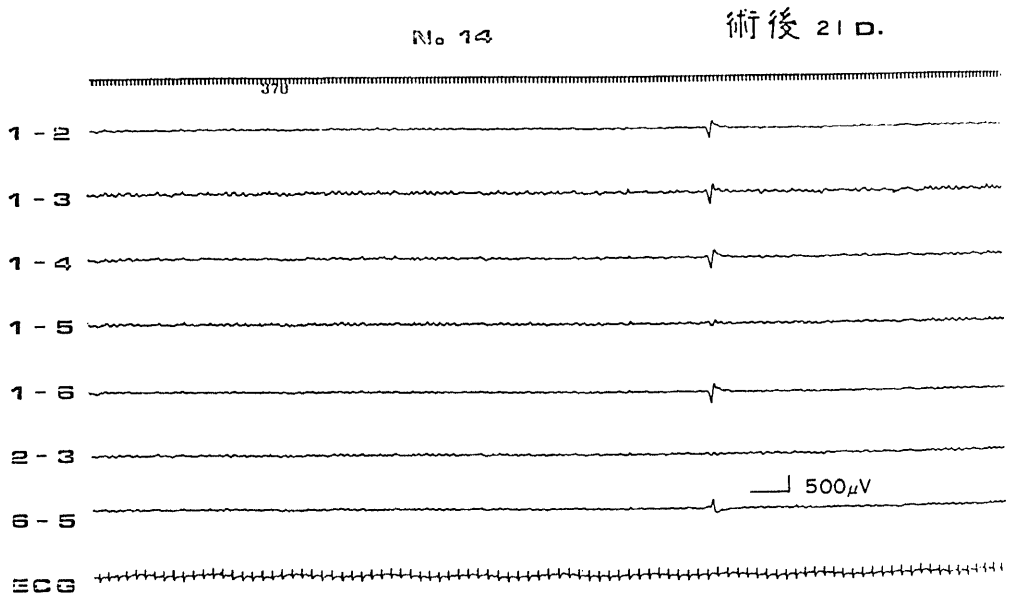


Fig. 4. EEG on 21 days after cobalt-gelatine application. Note active epileptiform discharges which are seen contralaterally.

験で用いたコバルトゲラチン (50 mg) で、発作波が記録されたものは5例であった。典型例を示すと術後2日目の脳波 (Fig. 2) では、発作波はどの誘導にも全く出現していない。術後7日目の脳波 (Fig. 3) では、一次焦点と考えられる部位に二相性の発作波が頻発するようになる。術後14日目の脳波では、6-5の誘導、即ち一次焦点の対側対称部位の、いわゆる mirror focus の位置に新たに発作波が出現するようになる。術後21日目の脳波 (Fig. 4) では、発作波は低電位となってきたが、mirror focus の位置の1-6、6-5で逆位相している所見がみられ、二次焦点が mirror focus の位置にあることが推測される。我々の観察した mirror focus の発作波は、いずれも一次焦点と同期して生ずる発作波であり、mirror focus にのみ単独で現れる発作波は、一例も観察されなかった。又、ガラスゲラチンを植えたものには、発作波は全く認められなかった。

II. コバルトゲラチン群の肉眼所見および光顕所見

1. 肉眼所見

コバルトゲラチン塗布部の一次焦点部位には、円形

の軟化巣が認められ、灰白色の壊死組織で軟化巣は満たされている。症例によっては硬膜が病巣に癒着しているものが見られることがある。一次焦点病巣は限局されており、隣接する部位の脳表面、脳膜に変化は見られない。

一次焦点の対称部位である mirror focus 部では、脳表面に肉眼的変化はなく、脳膜にも混濁などの変化は見られなかった。

2. 光顕所見

光顕によるコバルトゲラチン一次焦点部位の病理学的検索の詳細は、伊崎ら¹⁰⁾によって報告されているので、ここでは mirror focus 部の光顕所見について述べる。

H.E.標本 (Fig. 5)、およびニッスル標本 (Fig. 6,7) においてみると、細胞構築は分子層 (第I層)、比較的小型の錐体細胞層 (第III層) と並び、次に錐体細胞層がまばらとなり、わずかの顆粒細胞が混じる (第IV層)。その次に比較的大きな錐体細胞層 (第V層) となり、その次に小さな錐体細胞と顆粒細胞が混じる (第VI層)。これらの細胞構築に乱れはない。神経細胞の脱

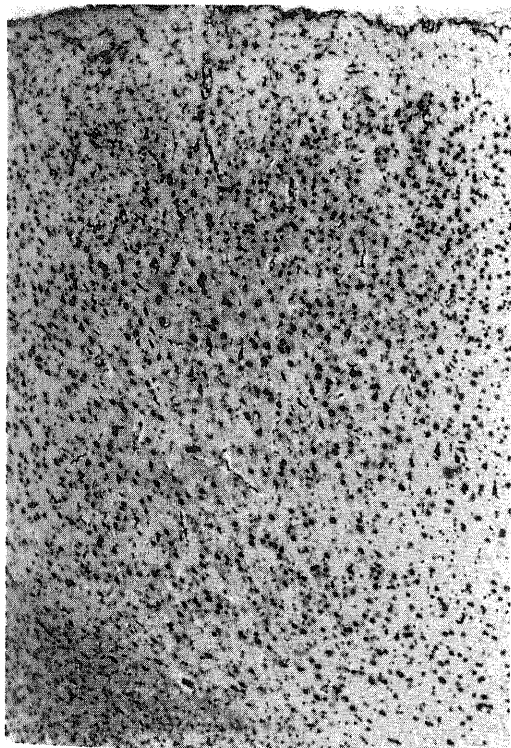


Fig. 5. Mirror focus. H. E. stain $\times 40$.

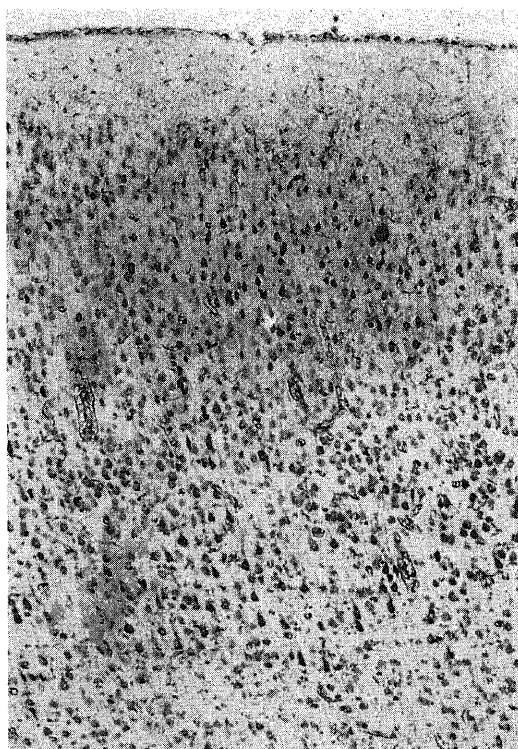


Fig. 6. Mirror focus. No definite pathologic changes are seen except for darkly-stained shrinking neurons. Nissl stain $\times 40$.

落は見られないが、錐体細胞はやや膨らんで、概して円みを帯びているものが多い。核は明るく見え染色質は少ない。核小体はほぼ中央に見られる。神経細胞の中には、ごく一部に萎縮性変化を示すものがあり、核が消失し、強く萎縮した細胞も見られた。ビルショウスキー鍍銀法では、神経細胞内に嗜銀性封入体は認められなかった。神経膠細胞は、軽度の増殖が見られ、主に星状膠細胞の増殖であったが、ホルツァー法(Fig. 8)ではグリア線維の増殖は殆ど見られない。

以上をまとめると、細胞構築の乱れはなく神経細胞は、胞体が明調化のものと、まれに萎縮性変化を示すものが見られた。星状膠細胞の増殖が見られたが、線維性グリオージスは見られなかった。

III. 電顕所見

1. 正常対照群とガラスゲラチン群

正常対照群とガラスゲラチン群の対側対称部の電顕所見は差異を認めないので、ここに一括して述べる。

家兎の Area precentralis agranularis の細胞構築は、第四層を形成する内顆粒細胞層がなく、このため超薄切片で観察される神経細胞の殆どが錐体形を呈し、錐体細胞と同定される (Fig. 9)。この神経細胞の胞体には明瞭な核小体を含む核が存在し、核内にはクロマチン顆粒が均一にみられる。核小体は緻密な顆粒の集合体である顆粒部と 50 Å の太さの細かいフィラメントの集合体である線維部より構成されている。核

膜は二重構造を呈し、内側核膜は平滑であるが外側核膜は凹凸を示し、しばしばニッスル小体部の粗面小胞体の薄膜系に連続している。内側核膜と外側核膜は、ところどころで合して核孔を形成している。比較的稀に線維からなる格子構造、あるいは線維束の核内封入体が出現することがある。細胞質にみられるニッスル小体は、厚さ 70 Å の薄膜の小胞体と、その外面に付着するリボゾームにより構成される粗面小胞体の集塊である。リボゾーム顆粒は小胞薄膜の外面、あるいはその間の細胞質内に位置し、ロゼット状に 5~10 個集まるか、あるいは数珠状に並んでポリゾームの形を呈する。ニッスル小体部の粗面小胞体の内腔は電子密度小で、特別な物質を見いだしがたい。ミトコンドリアは細胞質内に多数分散して外側、内側の二重の薄膜を有し、内側の薄膜は内部にクリスタを形成している。ゴルジ体は、比較的大きな腔を有するゴルジ嚢と小さな球状のゴルジ小胞の集積からなる。ゴルジ小胞内には、しばしば密度大な物質が含まれる(ゴルジ顆粒)。ゴルジ薄膜の一部は、周囲の粗面小胞体の薄膜と連続している。この他、神経細胞質内には、径 8~10 μ の神経細線維、20~40 μ の細管構造である微小細管、リボフスチン顆粒、リゾゾーム、多胞小体が出現する。樹状突起は、その起始部では細胞体に似た構造を有するが、細胞体から離れるに従ってリボゾームは少なくなり、微小細管、神経細線維、ミトコンドリアの三者がみら

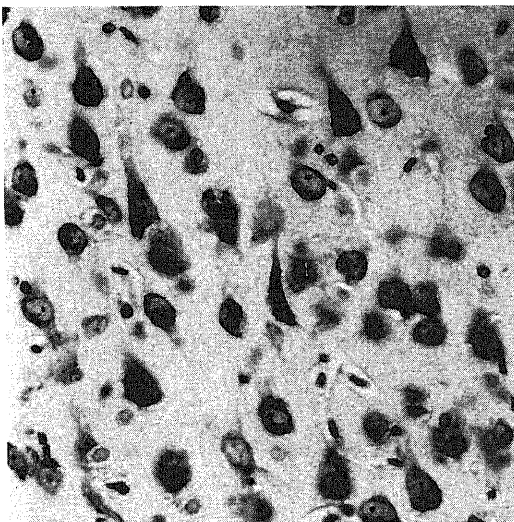


Fig. 7. Mirror focus. Higher magnification of the darkly stained shrinking neuron. Nissl stain $\times 800$.

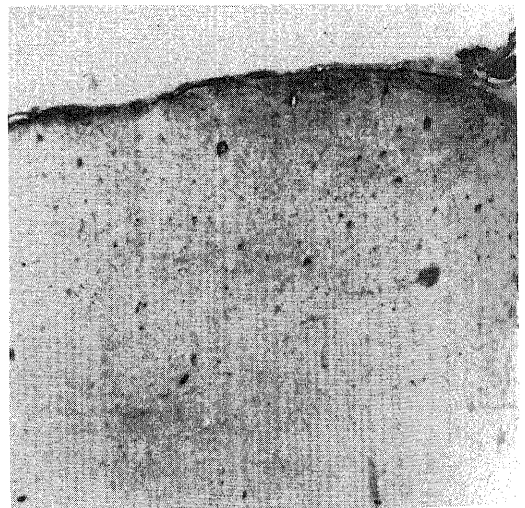


Fig. 8. Mirror focus. Slight proliferation of astrocytes are seen. Holzer stain $\times 40$.

れるようになる。軸索は神経細胞の起始円錐の部で粗面小胞体が急激にその量を減じ、代わってミトコンドリアを混じながら末梢を走る。神経細胞と、その突起の周囲は多数の稀突起細胞の突起によって囲まれ、さらにその外側は星状膠細胞の突起が埋めている。星状膠細胞は一方で、毛細血管周囲に脈管周囲膠小足を送り、稠密にこれを取り巻いている。星状膠細胞の核は、楕円系もしくは卵円形を呈し、核膜は内外二重の核膜より成り、両者は合しその部では核膜の構造を欠き、核孔を形成している。核内にはクロマチン顆粒が所々に集塊をなして存在し、不均等に分散しており、とくに内側核膜に接してクロマチン顆粒が集積している。細胞質内にはミトコンドリア、粗面小胞体、ゴルジ装置が存在するが、それらの量は少なく、このため細胞

質の電子密度は小である。突起の形態により、線維性星状膠細胞と形質性星状膠細胞に分けられ、前者は白質に多く、後者は灰白質に多い。シナプスは、軸索樹状突起シナプスの大部分が Gray I 型¹¹⁾で、無顆粒性のシナプス小胞が密に存在し、時に密度大な小顆粒を含む顆粒性小胞も存在する。シナプス膜の肥厚はシナプス後膜に比べシナプス前膜の方が厚く、シナプス隙は約 30 nm である。神経終末にはミトコンドリア、神経細線維、微小細管もみられる。後シナプスである樹状突起には spine apparatus が存在する。一方 Gray II 型¹¹⁾シナプスもわずかではあるが観察され、前シナプスには楕円系および球形のシナプス小胞がみられ、シナプス隙は 20 nm と薄い。シナプス膜の肥厚は、前膜、後膜と対称性である。その他の構造物は、Gray I



Fig. 9. Pyramidal neuron and the neuropil in the normal cerebral cortex of the control rabbit. $\times 7800$.

型と同様の所見が見られる。

2. コバルトゲラチン群

1) 神経細胞の変化

Area precentralis agranularisの神経細胞の細胞体核周囲には、ゴルジ装置、粗面小胞体、ミトコンドリアが認められるが、これらの出現頻度、分布、形状において、正常対照群との間に若干の差がみられた。粗面小胞体は、パンケーキ状に層をなして重なりあっているものが少なく、規則正しい配列をしているものもみられず、一見して乱れた像を呈しているものが多かった。粗面小胞体の槽の形は、屈曲したり、複雑に折れ曲がっているものも認められ、又、槽が二枚重なり合ったものがみられ、この重なり合っている部分にはリボゾームが付着していなかった(Fig. 10, 11)。粗面小胞体の中には、槽が軽度の開大したものがみられた

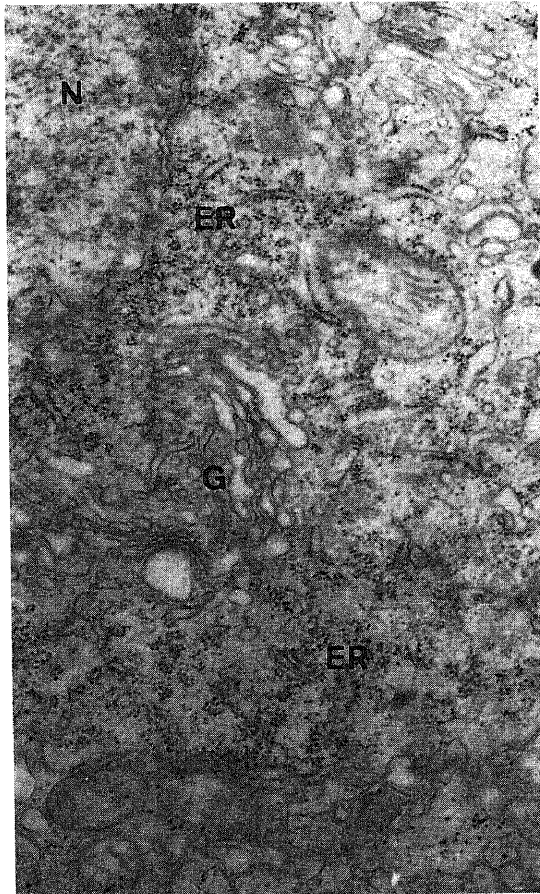


Fig. 10. Pyramidal neurons are devoid of normally existing long, parallel stacks of granular endoplasmic reticulum. $\times 15000$.

が、その中は腔になっており、特別の構造物は認められなかった(Fig. 12)。リボゾームは集まってロゼット形成しているものや、遊離リボゾームが見られたが、それらの数は正常対照群と比較して多く認められ、同時に粗面小胞体も増加しており、これらの神経細胞は暗調を呈していた(Fig. 13)。ごく一部には、粗面小胞体の分布密度が減少し、粗面小胞体の槽の長さが縮少して、リボゾームの分布密度も低い神経細胞が認められ、この神経細胞の胞体は、明調を呈していたが、核に変化はみられなかった(Fig. 14)。ゴルジ装置は概ね正常対照群との間に差はみられなかったが、一部には槽の長径が、 6μ という長い拡がりを持つものがみられた。ミトコンドリアの形状は、円形から楕円形を示すものが多く、大きさも $0.2\sim 0.8\mu$ で、正常対照群との間に差はみられなかったがクリスタが正常構造を失い、中にはクリスタが消失して空胞化しているものも認められた。一部の錐体細胞には、大きさや形状は変化がないが、正常細胞群とは異なり細胞質内のミトコ

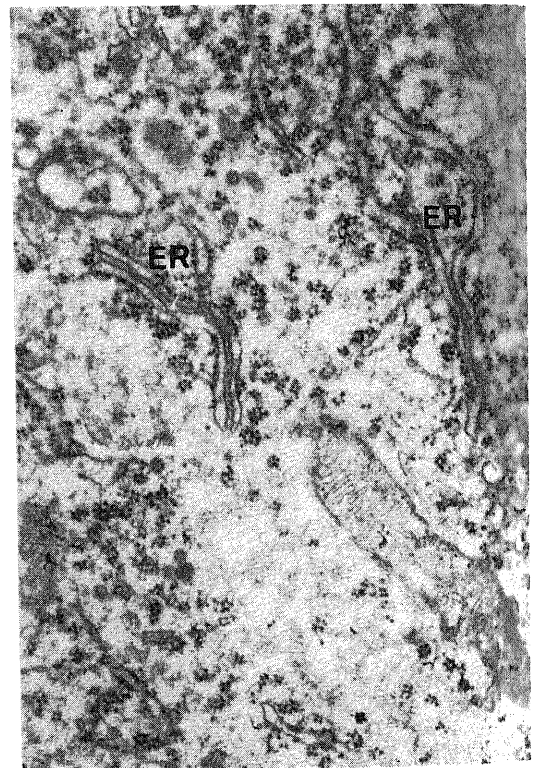


Fig. 11. Two cisternae of granular endoplasmic reticulum are contact with each other in the cortical neuron and ribosomes are not seen between the cisternae. $\times 11000$.

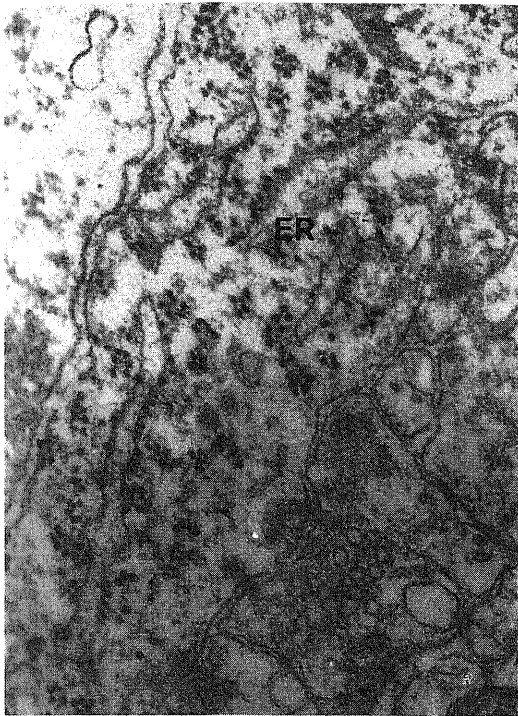


Fig.12. Pyramidal neuron exhibiting distended cisternae of granular endoplasmic reticulum. $\times 30000$.

ンドリアの分布密度の高いものが認められた。これらの細胞ではミトコンドリアが核を取り囲むように分布するものと (Fig. 15), 樹状突起起始部の細胞質に分布するもの (Fig. 16) とが見られ、二つの異なった分布様式を示していた。前者の核は比較的正円形で、核内クロマチン顆粒の分布や、核小体に変化は見られなかった。細胞質全体でみると、粗面小胞体もゴルジ装置も良く発達しており、リポフスチン顆粒は他の錐体細胞より多くみられた。一方後者では、核は不正形を呈し、核膜の嚢入が著しく、嚢入した部分は、粗面小胞体およびリボゾームで満たされていた。細胞質の粗面小胞体とリボゾームの分布密度も、対照群の錐体細胞と比べると高く、又粗面小胞体の槽が不規則な大きさと、折れ曲がったり、重なり合っているものが見られた。ゴルジ装置の付近には cored vesicle が多数認められリゾゾーム、リポフスチン顆粒も正常対照群と比べ多く認められた。両者の細胞質の変化で共通している点は、粗面小胞体、ゴルジ装置、リボゾームなどの細胞内小器官が発達しており、リポフスチン顆粒が多く認められたことである。一方両者の細胞質の変化で著しい差は見られなかった。

錐体細胞の核の多くは $8 \sim 18 \mu$ の大きさと正円形を示すものが多いが、核内クロマチン顆粒の分布密度

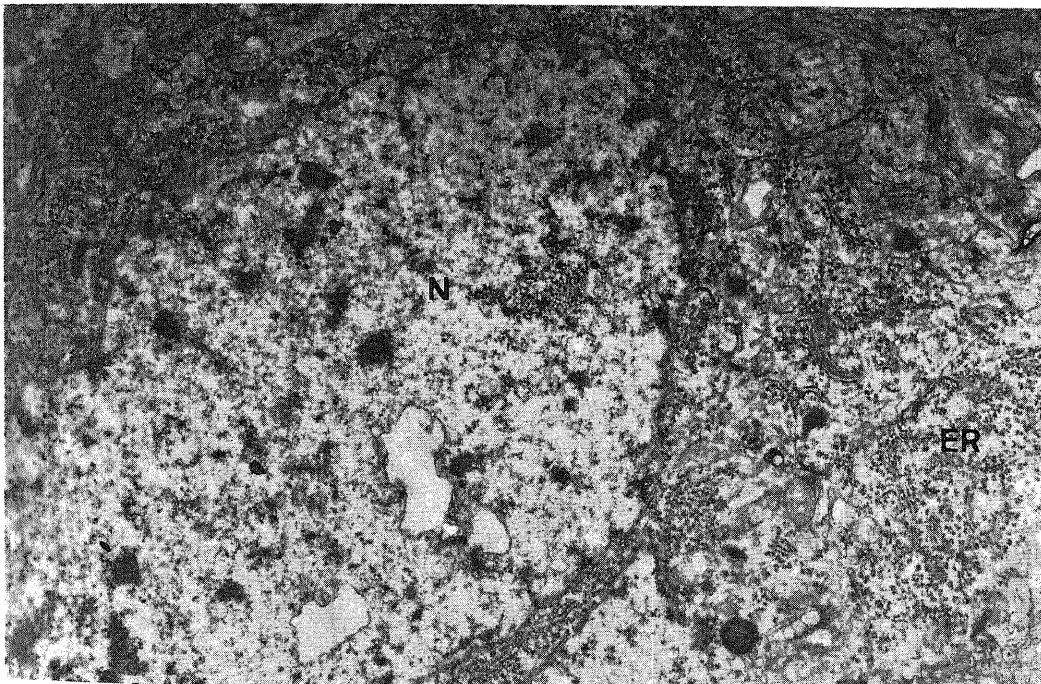


Fig. 13. Pyramidal neuron has abundant granular endoplasmic reticulum and free ribosomes, so the cytoplasm are dark. $\times 8000$.

が高く、クロマチン顆粒はところどころで集塊をなし、核全体が暗調を呈するものが見られた。この暗調を呈する核の細胞質は粗面小胞体の発達が悪く、遊離リボゾームが多く認められミトコンドリアのクリスタは正常構造を失っているものが多かった。一部の錐体細胞の核は、核膜ひだの著しい彎入を示し、彎入した部分は粗面小胞体やリボゾームで密に満たされていた (Fig. 17)。この錐体細胞は粗面小胞体、ミトコンドリア、リボゾームが比較的多く、前述のミトコンドリアが増加している細胞と同一の変化を呈しているものであると考えられた。

核内封入体は、微細構造上三種類の異なる型が認められた。一つは正常対照群にはみられなかったもので、円形の同心円状の層構造をなしており membranous

cytoplasmic bodies に類似する構造を示している (Fig. 18)。即ちこの核内封入体の微細構造は、大きき $0.2 \sim 1 \mu$ で核内の内側核膜近くの一部分に偏在し、数個出現していた。個々の膜の厚さは約 20 nm で不規則に波うつように蛇行して渦を巻き、同心円状に重なり合っている。大きいものでは十数枚の膜より構成されているが、ところどころで隣接する二枚の膜が合し、一対の膜を形成している。膜の間には空間が存在し、この空間にはクロマチン顆粒などの物質は全く存在しないが、この封入体の中心部に小顆粒が認められることがある (Fig. 19)。他の二つの核内封入体は、正常対照群にもみられたものであるが、その中の一つは線維束でこれを横断面でみると、太さ 70 \AA の線維が正常対照群と比べると粗に束をつくり、全体としては直径

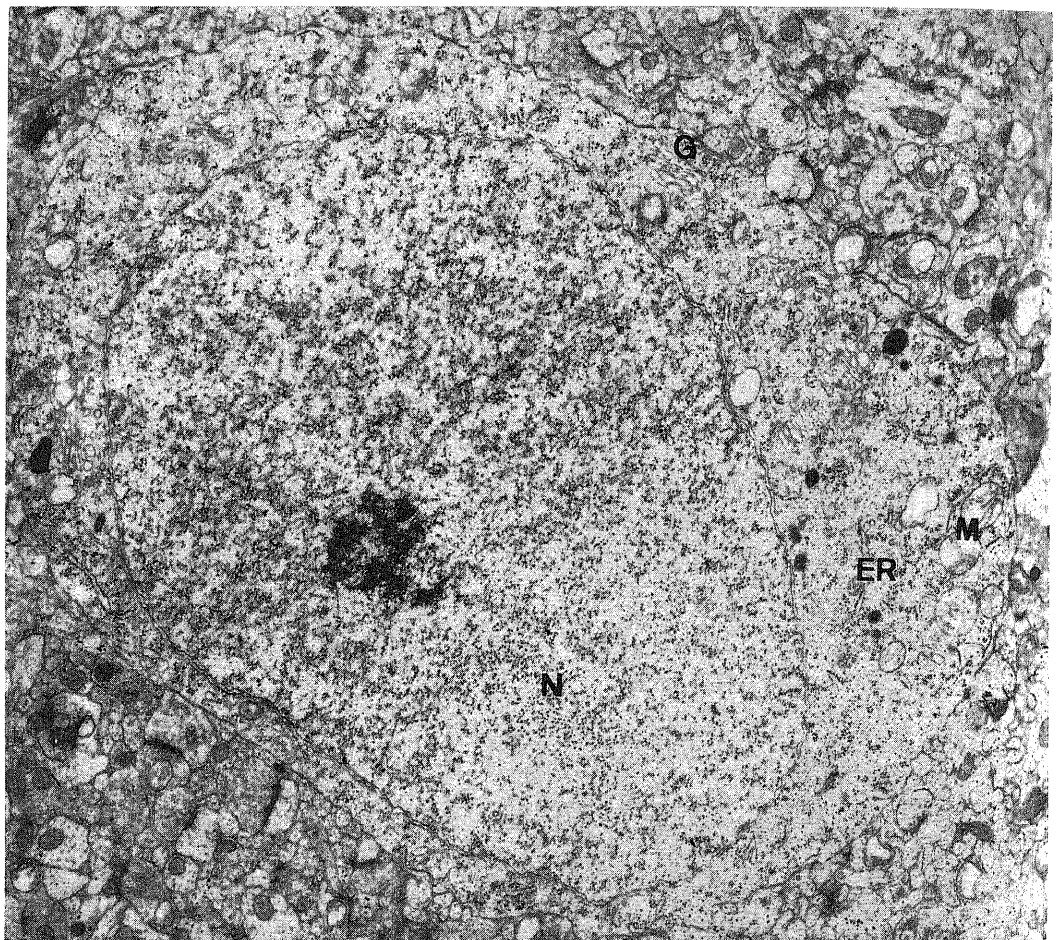


Fig. 14. No regular stacks of granular endoplasmic reticulum are found in the pyramidal neuron. The granular endoplasmic reticulum consisted of very short units randomly disposed in the perikaryon. $\times 10000$.

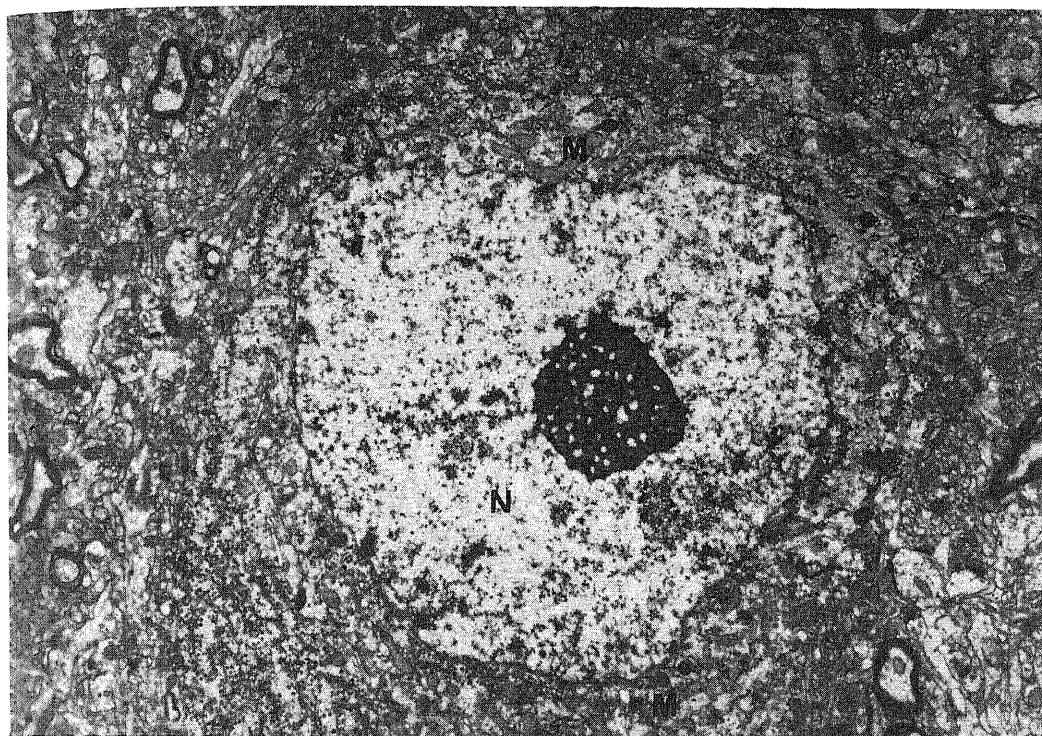


Fig. 15. Mitochondria increase in number around the nucleus of pyramidal neuron. $\times 6000$.

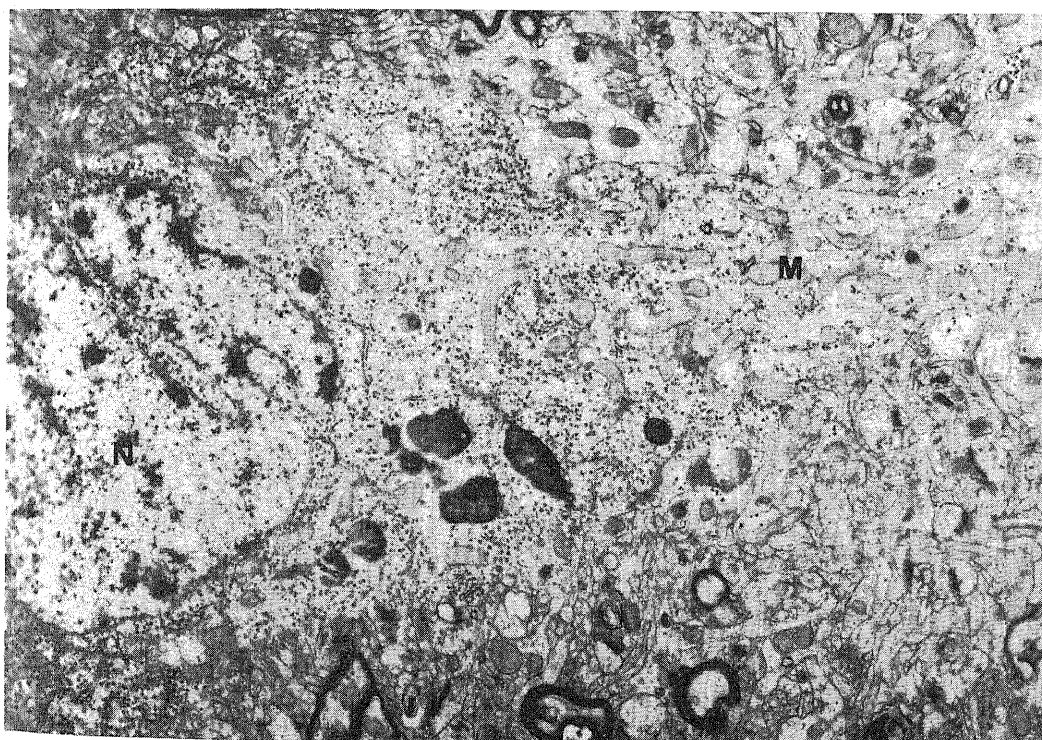


Fig. 16. Numerous mitochondria are shown in the origin of dendrite. $\times 6000$.

0.4~0.5 μ の円形を呈している。縦断面では、この線維束は紡錘形又は楕円形を呈し (Fig. 20), 長さは2~3 μ である。この封入体を持つ核のクロマチン顆粒の分布は均一であるが、線維束の周囲はクロマチン顆粒の分布が粗となることが少なく、正常対照群と比べるとハロの形成はみられない。又線維束の内部にクロマチン顆粒は認められなかった。多くの錐体細胞では、線維束は核小体の近傍にみられるが、まれに線維束が核小体の線維部を貫いている像もみられた (Fig. 21)。他の一つの核内封入体は、線維状格子構造を示し (Fig. 22), 径 70 Å の細線維が 80 Å の間隔で規則的に配列し、これに同様の細線維が約 40~55° の角度で交叉していた。この線維状格子は全体の幅が 0.1~0.2 μ で、長さは2~3 μ であるが、時に 10 μ に及ぶものがみられ、途中が彎曲したものもみられた。線維状格子構造の周囲には正常対照群と異なり、クロマチン顆粒がみられハロ形成がみられなかった。これらの細胞の核周部は粗面小胞体が良く発達しミトコンドリアは軽度増加していた。

以上のコバルトゲラチン群家兎の mirror focus 部の神経細胞の変化をまとめると、

1. 核周部の粗面小胞体の槽の開大したものが認められ、粗面小胞体は不規則な形状をしたものが多かった。又粗面小胞体とリボゾームが増加した細胞が認められ、この細胞は暗調を呈していた。

2. 一部の錐体細胞は、粗面小胞体が縮小し分布密度も低く細胞全体が明調を呈するものがみられた。

3. ミトコンドリアが核周部に多く分布している細胞と、樹状突起起始部に多く分布している細胞とが認められた。

4. 核膜の彎入が著しく、彎入した部分が粗面小胞体とリボゾームで密に満たされている細胞がみられた。

5. 同心円状層構造と、線維束と、線維状格子構造の三種類の核内封入体が観察された。

2) 神経突起の変化

有髄神経線維の中で一部の軸索に変化がみられた。この軸索は全体には他の軸索と比べると大きく腫脹しており、その内部は多数の器官が集積している。それらのうち主なものは、種々の濃度の dense body, 層構造をもった dense body, 大小の小胞, 多数のミトコンドリアなどである。これらの形態は Lampert¹²⁾の主張

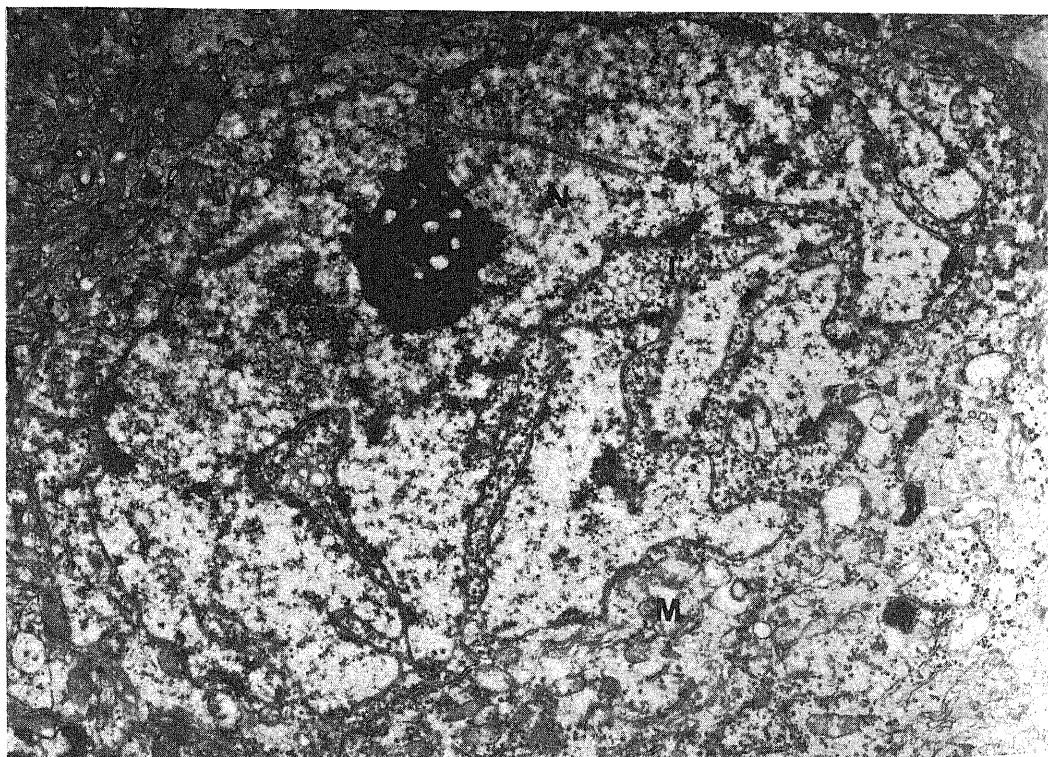


Fig. 17. Pyramidal neuron. Extensive invaginations of the nucleus are observed. $\times 8000$.

した degenerative axon と同一の所見を呈していた。その他の大部分の有髄神経線維は、正常対照群との間に差は見られなかった。樹状突起は一部のものに大小の空胞がみられ、この空胞はミトコンドリアが腫脹したもので、それ以外は正常対照群との間に差は見られなかった。樹状突起のシナプス部分の変化については後述する。

3) シナプスの変化

家兔の area precentralis agrularis の第III層～IV層のシナプスの形態をみると、正常対照群と同様に大部分は Gray I 型シナプスであった。Gray I 型シナプスの前シナプス終末においてシナプス小胞の分布密度は様々なものがみられるが、その中で正常対照群には見られない、分布密度の低いものが多く認められた (Fig. 23)。これら分布密度の低いシナプス小胞は特にシナプス接合部に集まっている傾向がある。これらの前シナプス終末は、対照群と同様に bouton 様にふくらみ、腫脹は見られない。小胞の大きさも 40～50 nm の球形で、対照群のシナプス小胞と変わりなく、小胞

の濃度および形態で特異的な変化は見られなかった。このシナプスに存在するミトコンドリアも形態的に変化はなく、分布密度も変化はみられない。シナプス前膜の肥厚は、正常対照群と同様でありシナプス後膜も明瞭に認められる。後シナプスにはミトコンドリア、spine apparatus、多胞小体が見られ、これらに微細構造上、正常対照群との間に差はみられなかった。シナプス隙は約 20 nm で間隙物質が存在し、変化は認められない。一方 Gray II 型のシナプスは、対照群と同様 I 型シナプスと比較し、出現頻度は著しく低かった。Gray II 型のシナプス小胞は、正常対照群と比較して差がみられず I 型のように小胞が減少しているシナプスや、小胞が偏在しているシナプスはみられなかった (Fig. 24)。以上をまとめると、mirror focus 部のシナプスの変化として、Gray I 型シナプスにおいてシナプス小胞の減少と、小胞がシナプス接合部に集まる傾向がみられた。

4) 星状膠細胞の変化について

星状膠細胞は、正常対照群と比較して増加がみられ、

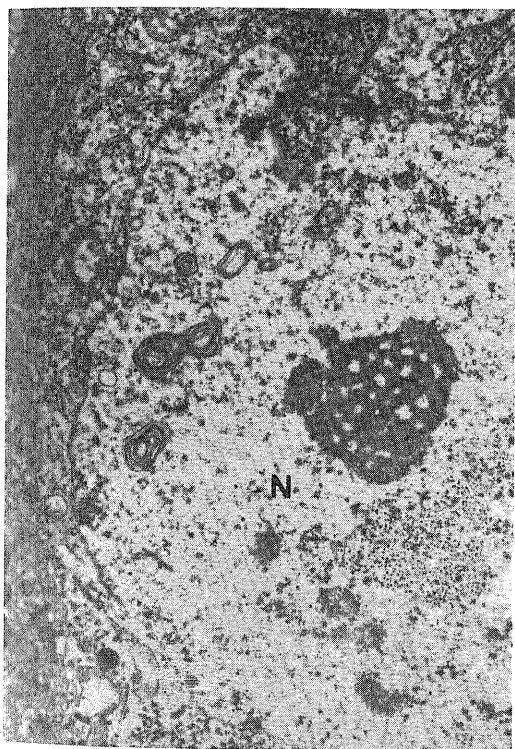


Fig. 18. Intranuclear inclusion bodies similar to membranous cytoplasmic bodies are found in the pyramidal neuron at mirror focus. $\times 5800$.

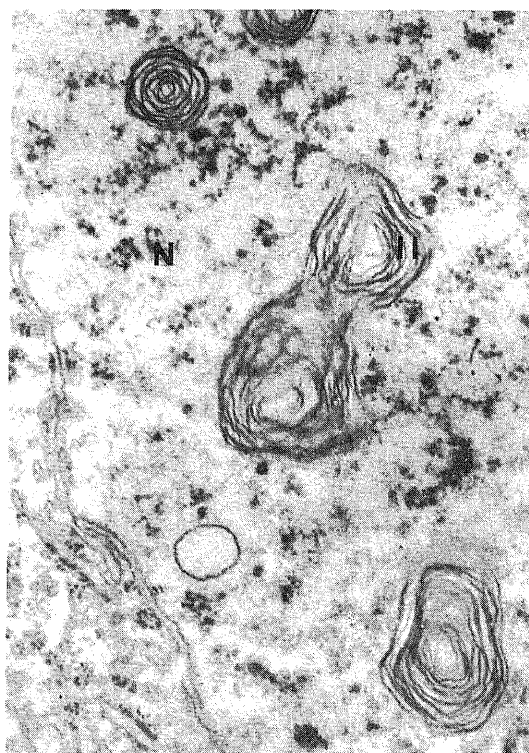


Fig. 19. Higher magnification of the intranuclear inclusions of Fig. 18. $\times 24000$.

その中で特に線維性星状膠細胞が増加していた。線維性星状膠細胞 (Fig. 25) の細胞内小器官は、粗面小胞体が核周部にみられるが、分布密度は正常対照群と比べて極めて少なく、槽の腫脹した粗面小胞体が多かった。この腫脹した腔には特別の構造物は認められなかった。ゴルジ体の分布密度、および大きさは正常対照群との間に差は見られなかったが、核側、いわゆる内側の槽は拡大し、液胞状を呈していた。すなわちゴルジ体は内側で一般に腫脹し、腫脹した液胞の内部は電子密度小で、均質無構造であった。ポリゾームの密度は正常対照群と比べきわめて小であるが、細胞質全体にほぼ均一に散在している。グリコーゲン顆粒は対照群と比べて増加は見られなかった。しかしミトコンドリアは対照群と比べ増加が著しく、増加したミトコンドリアは星状膠細胞の突起起始部と核周部に集まって多くみられたが、個々のミトコンドリアの大きさや形態は対照群にみられるものと差はなかった。線維状星状膠細胞の核周部は、正常対照群と比べフィラメン

トの増加がみられ (Fig. 26)、これらのフィラメントは太さ 60 \AA で密に存在し、星状膠細胞の突起の方向に向かって直線的に配列しているが、一部には蛇行して配列しているフィラメントもみられた。星状膠細胞の核は、正常対照群との間に差はみられなかった。次に星状膠細胞の突起について述べる。細胞体と同様に太さ約 60 \AA のフィラメントを含んだ星状膠細胞の突起が、正常対照群と比べ多数認められ、そのフィラメントに富んだ突起の一部は、神経細胞の外側に密接して包囲している像が認められた (Fig. 27)。同様の突起がシナプス周囲にも認められ、又この突起がシナプスを直接とり囲む像が見られた (Fig. 28)。

以上、コバルトゲラチン群 mirror focus 部の星状膠細胞の所見としてミトコンドリアが増加し、粗面小胞体とゴルジ体の腫脹が認められる細胞が多数存在し、同時に多数のフィラメントを含んだ細胞質と、その突起の増加がみられ、フィラメントに富んだ突起の一部は神経細胞を直接とり囲み、また同様の突起がシナプ

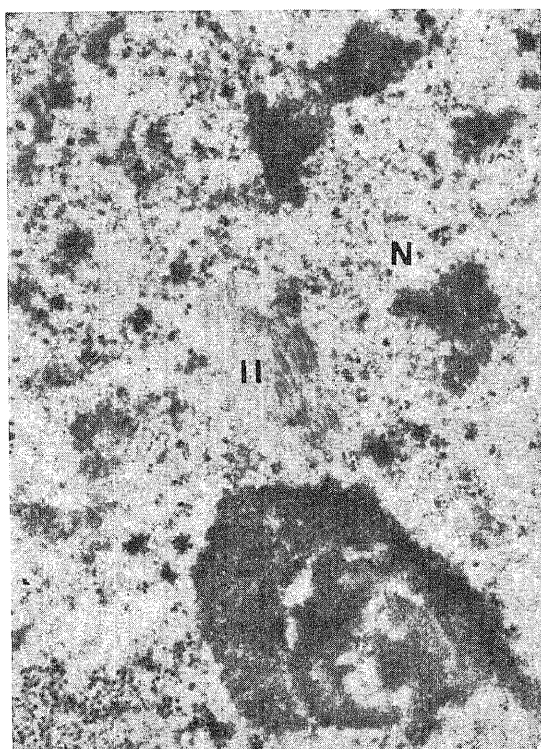


Fig. 20. A rodlet in the nucleus of pyramidal neuron is formed by a compact bundle of parallel filaments. A halo around the inclusions disappears. $\times 10000$.



Fig. 21. A cross-sectioned rodlet is penetrating the nucleolus of the pyramidal neuron. $\times 15000$.

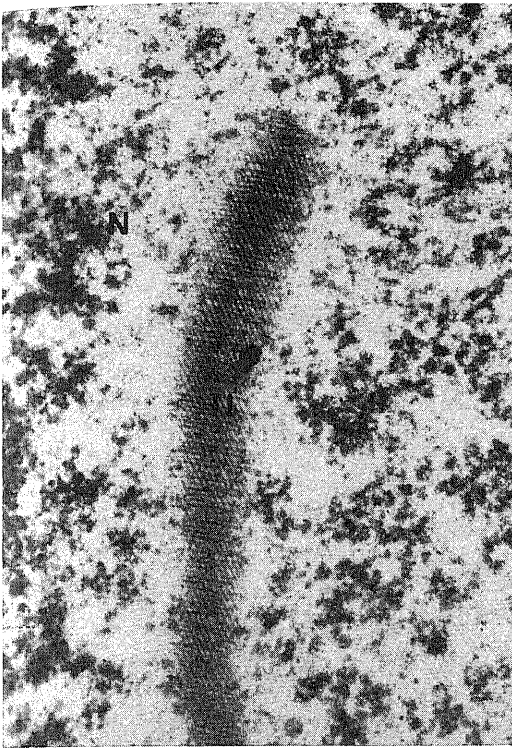


Fig. 22. Intranuclear inclusion bodies consisting of fine parallel fillaments arrayed in a lattice are found in some pyramidal neurons. $\times 48000$.

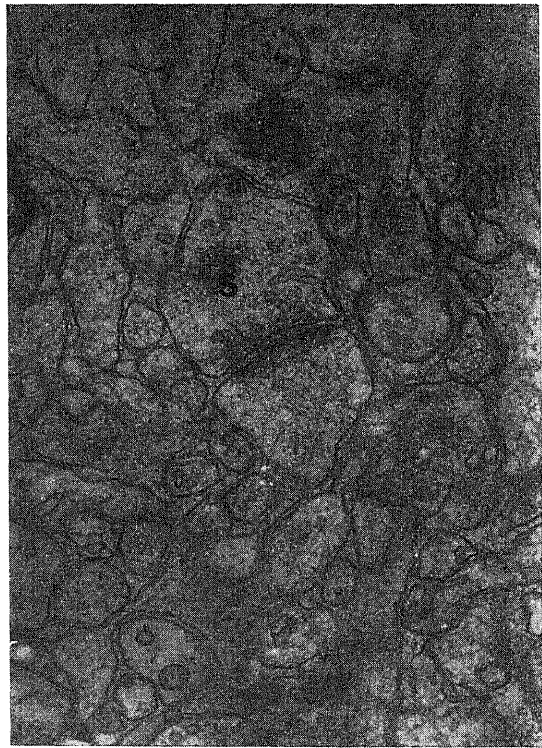


Fig 23. Gray I type synapse. The synaptic vesicles decrease in number and are packed together to the synaptic membrane. $\times 40000$.

ス周囲にも多数存在し、シナプスを直接とり囲む像も見られた。

考 察

1. コバルトのてんかん源性について

Dow⁴⁾は粉末コバルトをラットの大脳皮質に置き、反対側の運動発作を認め、この発作は術後2週間で始まり1~2日続いて消失したが、EEG 焦点は4~6週間続いたと報告した。Dimov¹³⁾も家兎にコバルトを用いてDow とほぼ同様の結果を報告している。Fischer¹⁴⁾はラットの大脳皮質にコバルトゲラチン棒を挿入することによりてんかん焦点を作製し、EEG 上に挿入後6~8日で挿入部位に発作波がみられたが、臨床発作はみられなかったと報告した。Kopeloff¹⁵⁾はコバルトをマウスの脳内に注入することにより、限られた期間に自発性臨床発作が出ることを確かめた。以上のよう報告者により動物の違いもあって若干の違いはみられるが、コバルトはてんかん源性の著しい物質として実験に用いられている。

コバルト以外の金属でもニッケル、アルミニウム、アンチモニー、ビスマス、カドミウム、タンタル、チタニウム、タングステン、バナジウム、ジルコニウムによって焦点性の発作波が出現するといわれている¹⁶⁾。Suzanne¹⁷⁾は、種々の金属が脳組織に与える影響を神経病理学的に調べている中で、組織変化の結果から次の3つのタイプに分類した。

I. Non-reactive: 金属と大脳皮質の境界には殆どグリオーゼがなく、表面より5 μm 以内にシナプスを伴った正常神経細胞がみられる。この変化を示す金属は合成樹脂、金、アルミニウム、プラチナ、タングステンがある。

II. Reactive: 多核巨細胞が著明で10 μm の幅で結合組織がみられる。この変化を示す金属はタンタル、二酸化珪素がある。

III. Toxic: 大脳皮質神経網からは結合組織のカプセルと星状膠細胞の帯により分離されている。この変化を示す金属に鉄、銅、コバルトがある。

毒性の変化を示す金属の中でもコバルトは星状膠細胞

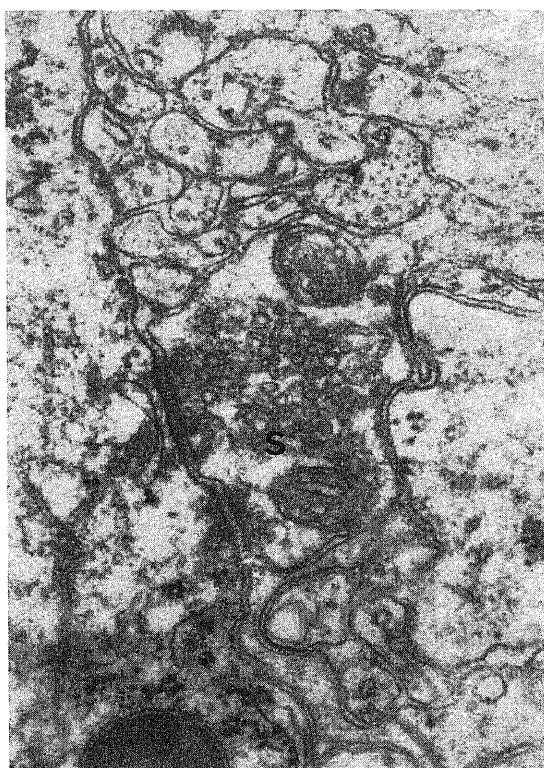


Fig. 24. Gray II type synapse. No definite pathologic changes are seen. $\times 4000$.

胞の帯が最も広く、最も組織毒性が強いという。同じように組織毒性が強い金属に銅があるが、Elizabethら¹⁸⁾によると同じような病理変化を示す銅とコバルトをラットに植え、ペンチレンテトラゾールによるてんかん閾値を調べた実験では、コバルトを植えたラットのてんかん閾値は著しく低かったのに対し、銅を植えたラットの閾値は高く、殆どてんかん源性を示さない結果が出ている。一方 Suzanne¹⁷⁾の報告で non-reactive タイプに属し、殆ど組織毒性のないアルミニウムがてんかん源性を示す物質として知られている。このコバルト、銅、アルミニウムの関係から、金属によるてんかん焦点の形成と組織毒性とは無関係のように考えられる。しかし Baleyrier¹⁹⁾の言うように、コバルトによる病巣の大きさと、発作の程度が量的に関係があるという報告もある。今回の実験ではコバルトによる組織毒性変化が大きい程、EEG 上に発作波が出現しやすい傾向が認められた。

実験でてんかんで、しばしば用いられる代表的な金属であるアルミニウムとコバルトのてんかん病巣における組織変化には、いくつかの共通点がみられる。それ

らを総合すると、神経細胞の喪失、星状膠細胞の肥大増殖、樹状突起の変性、および dendrite spine の減少、変形などである^{3)20)~23)}。

以上よりコバルトは組織毒性が強く、てんかん源性の著しく高い金属であり、てんかん発作発生機序は、星状膠細胞の変化、樹状突起の変化などに求められる。

2. コバルトによる mirror focus の形成について

Morrel²⁴⁾は塩化エチルを猫、および家兎の大腦表面にスプレーすると、2~3週間後に発作波が対側半球に拡がり、この二次てんかん病巣は常に対側の原発焦点の含まれる細胞の callosal termination の部であるとし、これを mirror focus と呼んだ。Morrel²⁴⁾は、反対側に生じる二次放電を dependent discharge と independent discharge に分類した。そして術後1~3日で現れる最初の二次放電は一次病巣よりの放電に同期して誘発される誘発電位であると述べ、これを裏づけるものとして、この時期にオシログラフイーで発作波を観察すると、一次放電に続いて多少の潜時をもって二次放電がみられると報告し、これを dependent discharge と呼んだ。その後一次病巣に同期しない独立した放電が mirror focus 部に現れ、これを independent discharge と呼んだ。同じような dependent discharge と independent discharge の出現を Goddard は燃えあがり効果でも述べている。Morrel²⁴⁾、Goddard²⁵⁾の主張した誘発電位が二次焦点の理由という考え方に対し、コバルトイオンが軸索輸送により運ばれ二次焦点を形成するという考え方がある。Pitmann²⁶⁾はコバルト塩が軸索路を通ることを報告した。Clayton²⁷⁾はラットにコバルトを植え、原子吸収分光光度法を使ってコバルトの拡がり調べ、術後6日目のラットで意義ある量のコバルトが mirror focus 部にみられたと報告し、コバルトを植えた部と線維連絡のある対側の尾状核と前頭葉のコバルトの量が同程度であることからコバルトが軸索輸送により拡がったと結論した。そして mirror focus におけるコバルトの量は、術後28日を過ぎると極端に少なくなり、90日後には完全に消失することを述べ、この理由は術後28日を過ぎると一次焦点に calcified glial capsule が形成され、これが障壁となってコバルトが拡がるのを妨げる結果、てんかん焦点の退行がおこるためであるとしている。Trottier ら⁶⁾は二次イオン微量分析法を用いてコバルトイオンの拡がり調べた結果、一次焦点と二次焦点 (mirror focus) におけるコバルトの量は術後8日目に最も多く、その後は減少して術後30日後には最少になると述べ、発作の起こり方がこのことと相関しているため、コバルトイオンの量と発作が関係あると結論した。これらの報告から考えてみると

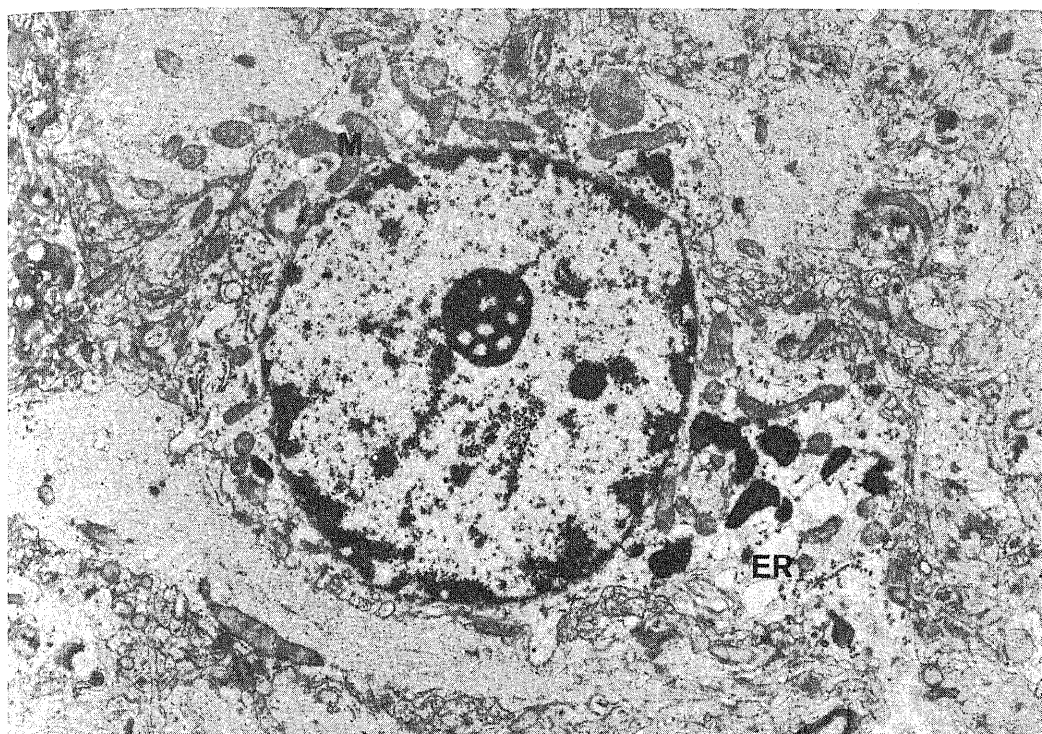


Fig. 25. Astrocyte in mirror focus. Numerous mitochondria and swelling of the granular endoplasmic reticulum are seen. $\times 8000$.

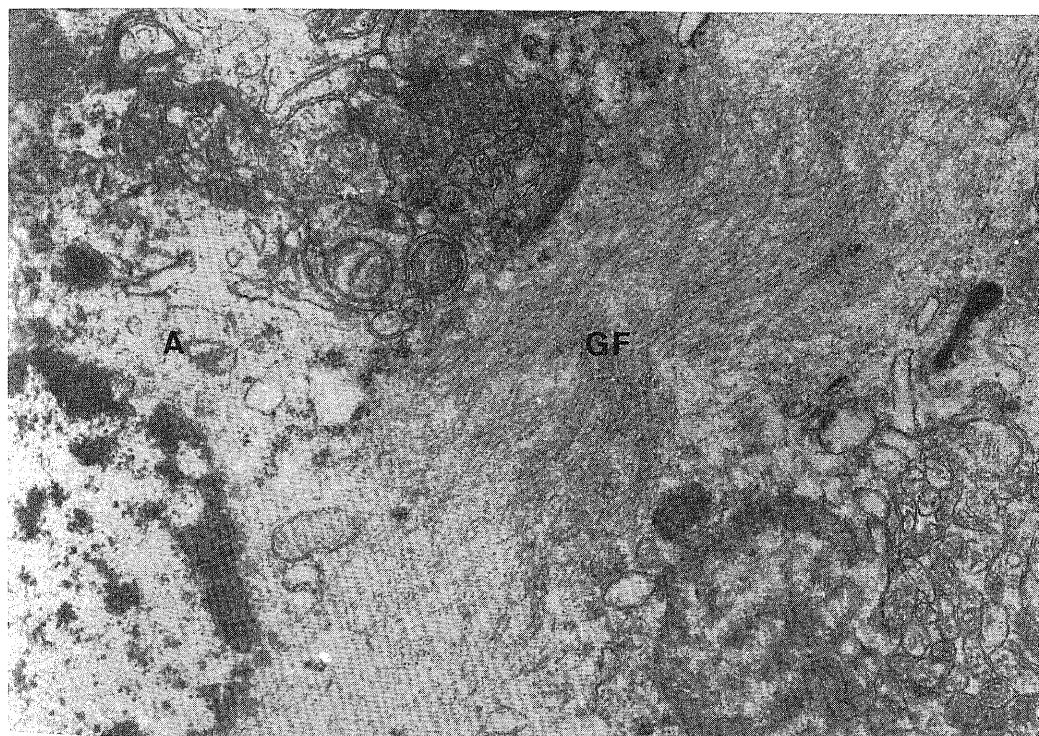


Fig. 26. Gliofilaments increase in the cytoplasm of the astrocytes. $\times 20000$.

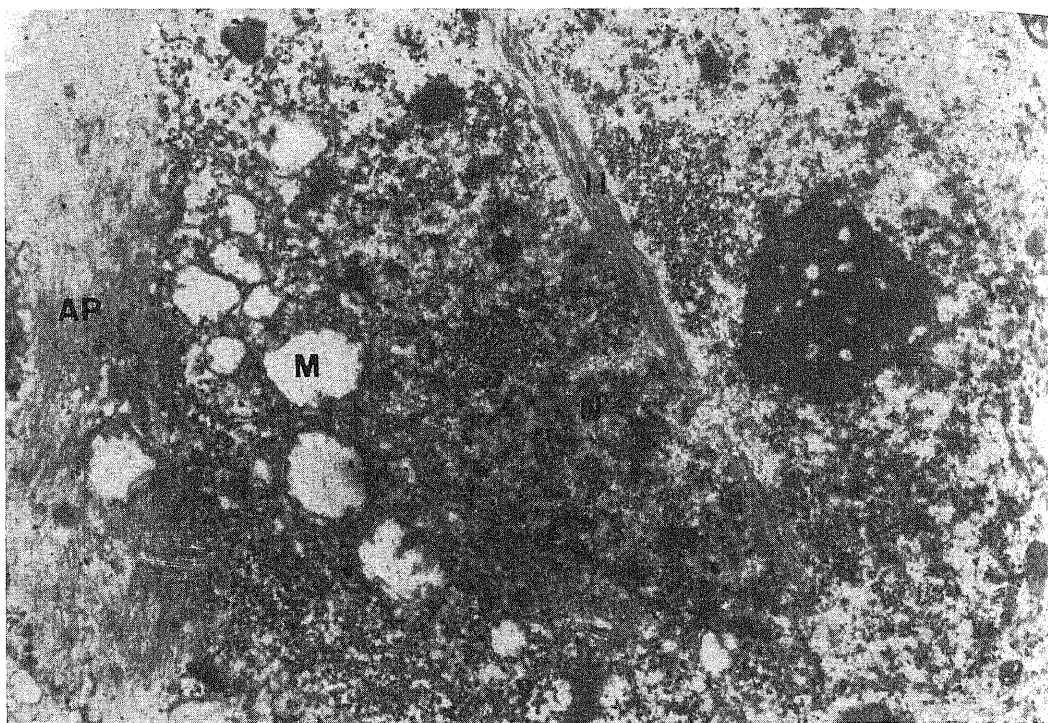


Fig. 27. An astrocytic process with densely packed gliofilaments is partly surrounding a neuron. $\times 14000$.

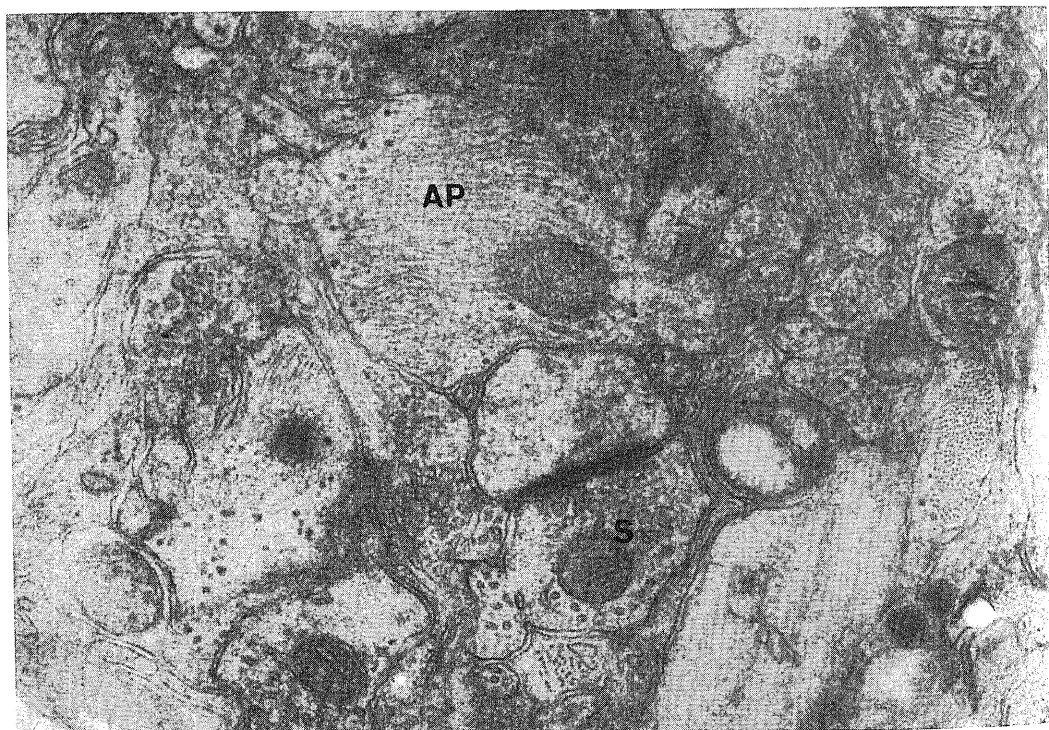


Fig. 28. There is outstanding increase in astrocytic filaments and the astrocytic process is partly surrounding the synapses. $\times 30000$.

mirror focus 形成についてコバルトは、軸索輸送される金属ということで特異的な存在であるといえる。

Dow⁷⁾によると、コバルトを植えた後 8~21 日で一次焦点が完成し、この時期にコバルトを取り除くと容易に発作波は消失し、21~28 日で mirror focus が完成し、この時期にコバルトを取り除いても一次焦点と mirror focus の発作波は消失しないという。同じことは Clayton²⁷⁾や Hartmann²⁸⁾も報告している。又 Dow⁷⁾によると mirror focus の形成には、コバルトを植える大脳皮質部位による差がみられ、後頭葉に植えたものでは mirror focus 部に発作波がみられた例が全くなかったのに対し、前頭葉に植えたものでは殆どの例に mirror focus が確認されたという。Mirror focus の形成に脳梁や大脳皮質構造、大脳皮質下部構造がどのように関係しているかは、充分解明されているとはいえない。Holubar ら²⁹⁾はラットにコバルトを植え込んで 6~8 日で一次焦点と同時に mirror focus にも発作波が認められ、2~3 週間経過したものは脳梁を切断しても、両側に同期した発作波が認められたと報告した。Morrel²⁴⁾は一次焦点を実験的に作製した後、様々な段階で脳梁を切断した結果、dependent な mirror focus 形成には脳梁が関係しているが、independent な mirror focus が完成した時点では脳梁を切断しても mirror focus に影響は出ないと述べた。Michael ら³⁰⁾は independent secondary epileptogenic foci には、脳幹が完全であることが必要であると述べている。Isaacson³¹⁾は脳梁が大脳皮質上の mirror focus 形成のための一次通路となっているが、交連神経路を切断した後でも mirror focus が存在し、これには脳幹を含む大脳皮質下経路が存在すると述べている。事実 Ottino ら³²⁾は脳梁、海馬交連、前交連、間脳を切断した猫でも、両側の同期性でてんかん性発作波がみられることを示し、この同期波が中脳を含む脳幹の長い切断で消失することを報告した。

今回の実験では前頭葉に焦点を作製し、術後 7 日目の脳波で一次焦点部位に発作波が確認され、術後 14 日目で mirror focus 部に発作波が確認された。この mirror focus にみられた発作波は、前述の Morrel²⁴⁾の述べた dependent discharge と考えられ、28 日目の脳波からも確認された。しかし independent discharge は全例に確認されなかった。今回の実験では術後 28 日までの記録であり、28 日以後二次放電がどのようにに変化するかは明らかではない。興味ある所見として、術後 14 日目の脳波では一次焦点部位の発作波の振幅が mirror focus 部より大であったものが、21 日目の脳波で逆に mirror focus 部の振幅の方が大きくなっていることがみられた。この振幅の逆転は、Turano³³⁾や

Ferrillo ら³⁴⁾がペニシリンを猫に用いた実験で、mirror focus が一次焦点を先導しているという所見に似ている。

3. 病理学的所見

1) 光顕所見について

コバルトやその他の物質を用いた実験でてんかんの mirror focus 部における光顕所見にはいくつかの報告がみられるが、殆どが正常組織と差のないことを述べている^{8)~9)}。これに対して Morrel³⁵⁾は種々の動物に塩化エチルによりてんかん焦点をつくる急性実験で mirror focus 部に暗調細胞が認められたことを報告した。Bogolepov³⁶⁾はコバルトゲラチン棒をラットに植え、対照群として熱凝固を施し、コバルトによる壊死巣と同じ大きさの壊死巣を持ったラットを作製し、mirror focus 部の光顕による観察をしたところ、コバルト群に虎斑溶解と神経グリアの satellitosis、および増殖が多く認められたと報告している。今回の実験結果では、星状膠細胞の増殖と神経細胞の萎縮性変化がみられたが、虎斑溶解の所見はみられず、経シナプス変性を示す所見もみられなかった。以上より、星状膠細胞の変化については Bogolepov³⁶⁾の所見と類似しているが、神経細胞の変化については若干の相違がみられている。同じコバルトを用いた実験でてんかんの中でも異なる結果がでていることについては、実験動物の違いや、壊死巣の大きさ、時間経過の差などを考慮する必要があると思われる。

2) 神経細胞の電顕所見について

暗調細胞について古くは Morrel³⁵⁾が光顕で mirror focus 部にみられたことを指摘し、この神経細胞が RNA に富んでいることを、オートラジオグラフィーを用いて調べ報告した。一方 Bogolepov³⁶⁾はラットの大脳皮質にコバルトゲラチン棒を植え mirror focus 部を電顕的に検索した結果、神経細胞の核膜ひだが深く入り込み、この入り込んだ部分の中にリボゾームが集積しているが、その他の細胞質のリボゾームとポリゾームは減少しており、神経細胞全体としてはこれらが減少していることを報告し、mirror focus で RNA や蛋白質の減少する所見と一致することを述べ、前述の光顕所見と合わせてこの変化を虎斑溶解とした。今回の実験では、核膜ひだの深い彎入と、そこにリボゾームが集積する所見が得られ、Bogolepov³⁶⁾の報告と一致するが、細胞質全体からみるとリボゾームは増加しており、このことは Morrel³⁵⁾の所見を支持するものである。

Chang と Payan³⁷⁾はコバルトをラットに植え、30 日後に mirror focus 部の電顕的検索を行い、神経細胞の粗面小胞体の変化として拡張と槽の縮小、及び積み

重ねが消失し、不規則に散らばって分布している所見がみられたことを報告した。Luse ら³⁸⁾はストリキニンを静注した動物実験で、大脳皮質神経細胞に粗面小胞体の開大がみられたことを報告し、ペンチレンテトラゾール³⁹⁾やメチオニン・スルフォキシミン⁴⁰⁾を用いた動物実験でも、粗面小胞体の腫脹がみられたことが報告されている。今回の実験でも粗面小胞体の変化が認められており、この変化は脳梁を通った放電が mirror focus 部に及んだ結果であると推測される。

核内封入体については、中村ら⁴¹⁾がコバルトゲラチンの家兎に用いた実験で、詳細に報告しているが、その中でも述べているように mirror focus 部には正常対照群とは異なり、ハロを失いかも個々の線維の配列が粗で、比較的小型の線維束が頻繁に出現していた。これらの線維束は正常家兎にも出現するものであり、封入体の出現そのものを病的ととらえることはできない。しかしハロを失った線維束は、中村ら⁴¹⁾の報告でも正常対照群に比しコバルトゲラチン群に多く出現し、しかも特に一次焦点周囲で比較的变化の軽微な神経細胞にみられたことは、ハロの消失が病的意味を持つものと考えている。このハロの消失の原因は核内クロマチン顆粒の増加と考えられ、神経細胞全体の病的変化が生じているものと推測しているが、又他方、線維の配列が粗になっていることは、封入体の体積が膨張したことを意味し、その結果ハロが消失したことも考えられる。

中村ら⁴¹⁾の報告した核内封入体以外に、mirror focus 部の神経細胞に、膜構造が何層にも重なりあった同心円状の封入体が確認された。この封入体は、構造的には GM₂ ガングリオシドで神経細胞の核周囲にみられる membranous cytoplasmic bodies に似ている。

3) 星状膠細胞の電顕所見について

Pollen と Trachtenburg⁴²⁾は、神経興奮の増大や、膜の不安定さの原因を神経生理学的機構の異常に求め、「焦点性てんかん病巣の周囲において、神経細胞体と樹状突起を包むような星状膠細胞の突起の変化が生じる。このような形質性から線維性星状膠細胞への変化は、再分極の結果として細胞外にカリウムを溜めることとなり、この細胞外、特に膜外のカリウムは膜の不安定さを生じることになり、神経細胞の異常な脱分極を生じる。」という仮説をたてた。Zuckermann⁴³⁾は、実験てんかん焦点は細胞外のカリウム濃度が増加することにより賦活されることを報告し、この原因が脳局所の細胞間隙で増加したカリウムを正常な状態に調整する神経膠細胞の障害にあると推論した。その後 Baleyrier⁴⁴⁾は、猫の大脳皮質にコバルト樹脂小球

を植え、樹脂小球のみを植えたものとの比較を行い、一次焦点における微細構造を報告した中で、線維に富みグリコーゲンを含んだ星状膠細胞の突起が神経細胞の核周囲にみられる所見が、コバルト樹脂小球群で多いことを報告した。Brown ら⁸⁾は、猫の海馬に塩化コバルトを植え、一次焦点部位の星状膠細胞の腫脹とその突起の著明な増殖とを報告した。Bulter ら⁴⁵⁾は、ラットの大脳皮質上に塩化コバルトを置き、一次焦点部位の星状膠細胞の突起の腫脹を報告した。小山⁴⁶⁾はコバルトゲラチンの家兎の大脳皮質に植え、彼女の言う反応帯において、増殖した星状膠細胞によるグリア膜の形成と星状膠細胞の突起の増加を報告した。以上のようにコバルトによる一次焦点部位の星状膠細胞の変化は、大体一致しているように思われる。このような星状膠細胞の変化は、アルミナクリームによる実験てんかん⁴⁷⁾や、ヒトのてんかん⁴⁷⁾でも報告されている。今回の実験では、腫脹した星状膠細胞が見られ、さらに線維に富んだ星状膠細胞の突起が錐体細胞を包囲している所見が mirror focus 部にも認められた。一側を電気刺激すると、mirror focus 部の細胞外カリウムが増加することが Hotson⁴⁸⁾や Sybert⁴⁹⁾によって報告されている。これらの報告から推測すると、すでに述べたように dependent discharge を起こしている mirror focus 部は、反対側、即ち一次焦点からの電気刺激を受けている状態と考えられ、mirror focus 部の細胞外カリウムが過剰になっていることが考えられる。星状膠細胞とカリウムの関係については多くの研究がみられ、Hertz⁵⁰⁾は星状膠細胞の役割の一つとして、神経細胞の興奮の過程で遊離されたカリウムを取り込んで、神経細胞周囲のイオン環境の急激な変化を起こさないような緩衝作用を営んでいると述べた。さらに Glotzner⁵¹⁾は、てんかん焦点の神経膠細胞は他の非てんかん性大脳皮質の神経膠細胞よりカリウムを運搬する能力があると報告している。これらのことから今回の実験での星状膠細胞の変化は、mirror focus 部の過剰なカリウムを運搬するための生体防御機構として、星状膠細胞の突起が関与したものと考えている。言い換えると本実験の星状膠細胞の変化は、神経細胞の異常発火の原因というよりはむしろ結果として起こっている変化と考えている。

4) シナプスの変化について

筋の終板⁵²⁾とか、上頸神経節⁵³⁾とか、中枢神経系のシナプス⁵⁴⁾⁵⁵⁾に高頻度で一定時間刺激を与えると、前シナプスの小胞の数が減少し、残っている小胞はシナプス膜に集中してくる (local vesicular population)。そして刺激を中止するとシナプス小胞の増加がみられるという。今回の実験で検索した mirror focus 部のシナ

プスは EEG の上からも一次焦点からの同期した放電がみられるように、刺激が持続的に伝わっている部位のシナプスと考えられる。故に本実験で Gray I 型シナプスに観察されたシナプス小胞の減少と local vesical population の所見は、一次焦点からの持続的な刺激の結果として生じたものであろう。Fischer^ら⁵⁶⁾⁵⁷⁾はラットにペニシリンを植えた急性実験で、今回の我々の実験結果と同じような mirror focus におけるシナプス小胞の減少と、小胞がシナプス膜に集まっている所見を報告している。

Korneliussen⁵⁸⁾によれば、シナプスに刺激を加えていると、最初は小胞の数が減少していくが、さらに刺激を加えていると、今度は小胞の数が増加してくるといい、これらが繰り返されるとシナプスは徐々に過代償の状態となり、シナプス小胞は最初の状態より増加すると述べている。Korneliussen⁵⁸⁾の報告より推論すると、local vesical population が生じた mirror focus にさらに長時間刺激が加わるとシナプスは過代償を生じ、シナプス小胞の数が増加する結果シナプスの興奮性が增大することが考えられる。この小胞の増加した状態では mirror focus のシナプスは、僅かの刺激でも興奮するようになり、この時期が mirror focus の神経細胞が自ら異常発火する状態、すなわち Morrel²⁴⁾のいう independent discharge が確立される時期である可能性もあると考えられる。

結 論

家兎の大脳皮質 (Area precentralis agranularis) にコバルトゲラチンを置いて、てんかん焦点病巣を作成し、対側対称部位 (mirror focus) を脳波的、光学顕微鏡的、電子顕微鏡的に検索し、次の結果を得た。

1. 脳波的所見

20 例中、5 例で mirror focus に一次焦点と同期性の発作波が記録された。

2. 光学顕微鏡的所見

神経細胞は、胞体が明調化を呈するものと萎縮性変化を示すものとが観察された。星状膠細胞は軽度の増殖が認められた。

3. 電子顕微鏡的所見

1) 神経細胞の変化

a) 粗面小胞体の配列が乱れ、槽の開大が認められる細胞が観察された。

b) 細胞質の粗面小胞体とリボゾームの分布密度が高い暗調細胞と、逆に粗面小胞体が縮小し、まばらな分布を示す明調細胞とが認められた。

c) ミトコンドリアが核周部に多くみられる細胞と、樹状突起起始部に多くみられる細胞とが認められた。

d) 核膜の彎入が著しい細胞がみられ、彎入した部分にはリボゾームと粗面小胞体が満たされていた。

e) Membranous cytoplasmic bodies 様の構造を持った核内入体が観察された。

2) 星状膠細胞の変化

a) ミトコンドリアの増加と、粗面小胞体の腫脹した細胞がみられた。

b) フィラメントに富んだ突起の増加が観察され、この突起の一部が神経細胞をとり囲んでいる像や、シナプスをとり囲んでいる像がみられた。

3) シナプスの変化

Gray I 型 (軸索樹状突起) シナプスのシナプス小胞の数が減少し、小胞がシナプス膜に集まる傾向が見られた。

以上の結果にもとずいて、コバルトゲラチンによる実験てんかんの mirror focus 部における神経細胞、星状膠細胞およびシナプスの変化と二次焦点形成機序について考察した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師、山口成良教授に深甚の謝意を表し、また終始直接御指導いただきました現富山医科薬科大学医学部中村一郎助教授に深く感謝いたします。さらに本研究の遂行に際し多大な御協力をいただきました金沢大学医学部神経精神医学教室小山善子博士、および写真その他で御協力していただいた池田輝男技官に心よりお礼申し上げます。

文 献

- 1) Jackson, J. H.: The lumbian lectures on convulsive seizure. Brit. Med. J., 1, 765-771 (1890).
- 2) Berger, H.: Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. Arch. Psychiat., 87, 527-570 (1929).
- 3) Kopeloff, L. M., Barrear, S. & Kopeloff, N.: Recurrent convulsive seizures in animals produced by immunological and chemical means. Amer. J. Psychiat., 98, 881-902 (1942).
- 4) Dow, R. C., Guardiola, A. & Manni, E.: The production of cobalt experimental epilepsy in the rat. Electroenceph. Clin. Neurophysiol., 14, 399-407 (1962).
- 5) Fischer, J., Holubar, J. & Malik, V.: A new method of producing chronic epileptogenic cortical foci in rat. Physiol. Bohemoslov., 16, 272-277 (1967).
- 6) Trottier, S., Truchet, M. & Laroudie, C.: Secondary ion microanalysis in the study of cobalt-induced epilepsy in the rat. Exp. Neurol., 76, 231

-245 (1982).

- 7) **Dow, R. C., McQueen, J. K. & Townsend, H. R.:** The production and detection of epileptogenic lesions in rat cerebral cortex. *Epilepsia* (Amst.), **13**, 459-465 (1972).
- 8) **Brown, W. J., Mitchell, A. G. & Babb, T. L.:** Structural and physiologic studies in experimentally induced epilepsy. *Exp. Neurol.*, **69**, 543-562 (1980).
- 9) **Mutani, R.:** Cobalt experimental amygdaloid epilepsy in the cat. *Epilepsia*, **8**, 73-92 (1967).
- 10) **伊崎公德・中村一郎・渋谷禎三・小山善子・勝川和彦・山口成良:** Cobalt-gelatine による実験てんかんモデル—光顕観察による基礎的研究—, 十全医会誌, **89**, 588-605 (1980).
- 11) **Gray, E. G.:** Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex. An electron microscope study. *J. Anat.*, **93**, 420-433 (1959).
- 12) **Lampert, P. W.:** A comparative electron microscopic study of reactive, degenerating, regenerating, and dystrophic axons. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **26**, 345-368 (1967).
- 13) **Dimov, S. D.:** Changes in the cerebral bioelectric activity of rabbits following application of cobalt to the brain cortex (formation and development of epileptogenic focus). Comparative and cellular pathophysiology of epilepsy. : Proceedings of the Symposium Liblice, September, 235-242 (1965).
- 14) **Fischer, J., Holubar, J. & Malik, V.:** Neuro-histological study of the developement of experimental epileptogenic cortical cobalt-gelatine foci in rats and their correlation with the onset of epileptic electrical activity. *Acta Neuropath.*, **11**, 45-54 (1968).
- 15) **Kopeloff, L. M.:** Experimental epilepsy in the mouse. *Proc. Exp. Biol. Fed.*, **104**, 500-504 (1960).
- 16) **Chusid, J. G. & Kopeloff, L. M.:** Epileptogenic effects of pure metals implanted in motor cortex of monkeys. *J. Appl. Physiol.*, **17**, 697-700 (1962).
- 17) **Suzanne, S. S. & Stensaas, L. J.:** Histo-pathological evaluation of materials implanted in the cerebral cortex. *Acta Neuropath. (Berl.)*, **41**, 145-155 (1978).
- 18) **Elizabeth, R. H., Brenda, K. C. & Charles, R. C.:** Epileptogenic properties of cobalt and metals applied directly to cerebral cortex of rat. *Epilepsia*, **15**, 121-129 (1974). Raven Press, New York.
- 19) **Baleyrier, C. & Quoex, C.:** Epileptic activity and anatomical characteristics of different lesions in cat cortex. Ultrastructural study. *Acta Neuropath. (Berl.)*, **33**, 143-152 (1975).
- 20) **Harris, A. B.:** Ultrastructure and histochemistry of alumina in cortex. *Exp. Neurol.*, **38**, 33-63 (1973).
- 21) **Ward, A. A.:** The epileptic neuron. Chronic foci in animals and man, p263-288. In H. H. Jasper, A. A. Ward & A. Pope (ed.), Basic mechanisms of the epilepsies, Churchill, London, 1969.
- 22) **小山生子:** 実験てんかん焦点の形態学的変化—コバルト誘発てんかん猫の運動領野錐体細胞の研究—. 神経進歩, **27**, 566-577 (1983).
- 23) **Fischer, J. & Brinzinger, K.:** Vorkommen von Glycogen in geschwollenen Dendriten bei experimenteller Kobaltnekrose des Rattengehirns. *Virchows Arch. Abt. B. Zellpath.*, **1**, 201-210 (1968).
- 24) **Morrell, F., Secondary epileptogenic lesions.** *Epilepsia*, **1**, 538-560 (1960).
- 25) **Goddard, G. V.:** Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature (Lond.)*, **214**, 1020-1021 (1967).
- 26) **Pitmann, R. M., Tweedle, C. D. & Cohen, M. J.:** Branching of central neurons: Intracellular cobalt injection for light and electron microscopy. *Science*, **176**, 412-414 (1972).
- 27) **Clayton, P. R., & Emson, P. C.:** Spread of cobalt from a cortical epileptic lesion induced by a cobalt-gelatin implant into the frontal cortex of the rat. *Experimentia*, **32**, 1303-1305 (1976).
- 28) **Hartmann, E. R., Colasanti, B. K. & Craig, C. R.:** Epileptogenic properties of cobalt and related metals applied directly to cerebral cortex of rats. *Epilepsia*, **15**, 121-129 (1974).
- 29) **Holubar, J. & Fischer, J.:** Electrophysiological properties of the epileptogenic cortical foci produced by a new cobalt-gelatine method in rats. An attempt to correlate the electrophysiological, histological and histochemical data. *Physiol. Bohemoslov*, **16**, 278-284 (1967).
- 30) **Michael, L., Woodruff, F. H. & Isaacson, R. L.:** Changes in focal epileptic activity produced by brainstem sections in the rabbit. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, **35**, 475-486 (1973).
- 31) **Isaacson, R. L.:** The role of the corpus

- callosum in the establishment of areas of secondary epileptiform activity. *Epilepsia* (Amst.), **12**, 133-146 (1971).
- 32) **Ottino, C. A.**: An experimental study of the structures mediating bilateral synchrony of epileptic discharges of cortical origin. *Epilepsia* (Amst.), **12**, 299-311 (1971).
- 33) **Turano, C. & Girvin, J. P.**: Observation on the "dependant stage" of the "mirror focus". *J. Neurosurg. sci.*, **27**, 73-76 (1983).
- 34) **Ferillo, F., Amore, R., Cavazza, B. & Rosadini, G.**: An experimental research on time relationships among focal and secondary epileptic spikes. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **50**, 1936-1940 (1974).
- 35) **Morrel, F.**: Physiology and histochemistry of the mirror focus, p357-374. In H. H. Jasper, A. A. Ward & A. Pope (ed.), *Basic mechanisms of the epilepsies*, Churchill, London, 1969.
- 36) **Bogolepov, N. N. & Pushkin, A. S.**: Sub-microscopic changes of cortex nerve cells in chronic mirror epileptic focus in rat. *Brain Res.*, **94**, 173-184 (1975).
- 37) **Chang, L. W. & Payan, H. M.**: Cobalt induced epilepsy. An ultrastructural study. *Neurol. Res.*, **1**, 19-29 (1979).
- 38) **Luse, S. A., Golding, S. & O'Leary, J. L.**: Seizure activity due to intravenous strychnine. An electron microscopy study of the cortex. *Arch. Neurol.*, **11**, 296-302 (1964).
- 39) **Roberts, E.**: Prospectus, epilepsy, and anti-epileptic drugs. A speculative synthesis, p667-713 In G. H. Glaser, J. K. Denny & D. M. Woodbury (ed.), *Antiepileptic drugs. Mechanism of action*, Ravan Press, New York, 1980.
- 40) **Harris, A. B.**: Cortical alteration due to methionine sulfoximine. *Neurology*, **11**, 388-407 (1964).
- 41) 中村一郎・遠藤正臣・細川邦仁・伊崎公德・小山善子・勝川和彦: 家兎大脳皮質神経細胞の核内封入体-Cobalt-gelatine 棒の脳内投与による超微形態変化-, 十全医会誌, **90**, 1-12 (1981).
- 42) **Trachtenberg, M. C. & Pollen, D. A.**: Neuroglia. Biophysical properties and physiologic function. *Science*, **167**, 1248-1252 (1970).
- 43) **Zuckermann, E. C. & Glaser, G. H.**: Activation of experimental epileptogenic foci. *Arch. Neurol.*, **23**, 358-364 (1970).
- 44) **Bulter, A. B., Willmore, L. J., Fuller, P. M. & Bass, N. H.**: Focal alteration of dendrites and astrocytes in rat cerebral cortex during initiation of cobalt-induced epileptiform activity. *Exy. Neurol.*, **51**, 216-228 (1976).
- 45) 小山善子: Cobalt-gelatine による実験てんかん焦点巣の電子顕微鏡的研究. 十全医会誌, **90**, 373-395 (1981).
- 46) **Harris, A. B.**: Cortical neuroglia in experimental epilepsy. *Exp. Neurol.*, **49**, 691-715 (1975).
- 47) **Miyamoto, S., Hara, Y., Tanikake, T., Aoyama, N. & Hori, Y.**: Pathophysiological study on epileptogenic focus. *Folia. Psychiat. Neurol. Jpn.*, **32**, 321-328 (1978).
- 48) **Hotson, J. R., Sybert, G. W. & Ward, A. A.**: Extracellular potassium concentration changes during propagated seizures in neocortex. *Exp. Neurol.*, **38**, 20-26 (1973).
- 49) **Sybert, G. W. & Ward, A. A.**: Changes in extracellular potassium activity during neocortical propagated seizures. *Exp. Neurol.*, **45**, 19-41 (1974).
- 50) **Hertz, L.**: Possible role of neuroglia. A potassium mediated neuronal-neuroglial-neuronal impulse transmission system. *Nature (Lond.)*, **206**, 1091-1094 (1965).
- 51) **Glötzner, F. L.**: Membrane properties of neuroglia in epileptogenic gliosis. *Brain Res.*, **55**, 159-171 (1973).
- 52) **Cecarelli, B., Hurlbut, W. P. & Mauro, A.**: Depletion of vesicles from frog neuromuscular junction by prolonged tetanic stimulation. *J. Cell. Biol.*, **54**, 30-38 (1972).
- 53) **Friesen, A. D. & Khatter, J. C.**: Effect of stimulation on synaptic vesicles in the superior cervical ganglion of the cat. *Experimentia*, **27**, 285-287 (1971).
- 54) **Molbert, E., Baumgartner, G. und Ketelsen, U. P.**: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Grosshirnrinde eder Katze nach Elektrokramphen. *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, **190**, 295-315 (1967).
- 55) **Perri, V., Sacchi, O., Raviola, E. & Raviola, G.**: Evaluation of the number and distribution of synaptic vesicles at cholinergic nerve-endings after sustained stimulation. *Brain Res.*, **39**, 526-529 (1972).
- 56) **Fischer, J. & Langmeier, M.**: Changes in the

number, size and shape of synaptic vesicles in an experimental, projected cortical epileptic focus in the rat. *Epilepsia*, **21**, 571-585 (1980). Raven Press, New York.

57) **Fischer, J.** : Change in the number of vesicles in the synapses of a projected epileptic cortical

focus in rats. *Physiol. Bohemoslov.*, **22**, 537-543 (1973).

58) **Korneliussen, H.** : Ultrastructure of normal and stimulated motor endplates. With comments on the origin and fate of synaptic vesicles. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **130**, 28-57 (1972).

Electron Microscopic Study of Experimental, Secondary Epileptogenic Focus (mirror focus) Produced by Cobalt-Gelatine Kazuhiko Katsukawa, Department of Neuropsychiatry, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — *J. J. Med. Soc.*, **94**, 758—780 (1985)

Key words: electron microscopy, experimental epilepsy, mirror focus, cobalt

Abstract

Cobalt-gelatine was implanted into the frontal cortex of 30 rabbits. Fourteen to 21 days after the cobalt-gelatine implantation the epileptic activity spread to the contralateral hemisphere (mirror focus). Tissue samples from the contralateral cortex were examined by electron microscopy. The results were compared with normal control cortex and with changes after glass-gelatine application of the symmetrical contralateral cortex. The most significant changes in the cobalt implanted rabbits were hypertrophy and proliferation of astrocytes. The astrocytic process with densely packed gliofilament was partly surrounding a neuron and a synapse. In the synapses of Golgi I type the vesicles were packed together to the synaptic membrane and their number decreased. An alteration of granular endoplasmic reticulum, a cytoplasmic invagination and increase of mitochondria were found in some cortical neurons. The brains of the control animals were free from any of these changes.